

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/074087 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 47/48, C08B 31/18

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/02083

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Februar 2003 (28.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 09 821.2 6. März 2002 (06.03.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BIOTECHNOLOGIE - GESELLSCHAFT MITTELHESSEN MBH [DE/DE]; Kerkrader Strasse 7, 35394 Giessen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEMBERGER, Jürgen [DE/DE]; Kiebitzweg 2, 63741 Aschaffenburg (DE).
ORLANDO, Michele [IT/DE]; Eichendorffring 107, 35394 Giessen (DE).

(54) Title: COUPLING PROTEINS TO A MODIFIED POLYSACCHARIDE

(54) Bezeichnung: KOPPLUNG VON PROTEINEN AN EIN MODIFIZIERTES POLYSACCHARID

(57) Abstract: The invention relates to a method for coupling proteins to a starch-derived modified polysaccharide. The binding interaction between the modified polysaccharide and the protein is based on a covalent bond which is the result of a coupling reaction between the terminal aldehyde group or a functional group of the modified polysaccharide molecule resulting from the chemical reaction of this aldehyde group and a functional group of the protein which reacts with the aldehyde group or with the resulting functional group of the polysaccharide molecule. The bond directly resulting from the coupling reaction can be optionally modified by a further reaction to the aforementioned covalent bond. The invention further relates to pharmaceutical compositions that comprise conjugates formed in this coupling process and to the use of said conjugates and compositions for the prophylaxis or therapy of the human or animal body.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Kopplung von Proteinen an ein von Stärke abgeleitetes modifiziertes Polysaccharid, wobei die bindende Wechselwirkung zwischen dem modifizierten Polysaccharid und dem Protein auf einer kovalenten Bindung beruht, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des modifizierten Polysaccharidmoleküls und einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Polysaccharidmoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins ist, wobei die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion zur obengenannten kovalenten Bindung modifiziert sein kann. Die Erfindung betrifft ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, welche die bei der Kopplung gebildeten Konjugate umfassen, und die Verwendung dieser Konjugate und Zusammensetzungen zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

WO 03/074087 A1

Kopplung von Proteinen an ein modifiziertes Polysaccharid

Die schnelle Entwicklung der Gentechnik in den letzten Jahrzehnten hat dazu geführt, dass eine Vielzahl von Genen für Proteine mit potentiell therapeutischem Nutzen identifiziert wurden und die entsprechenden Genprodukte mit Hilfe biologischer Expressionssysteme unschwer rein oder annähernd rein in größeren Mengen hergestellt werden können.

Es stellte sich jedoch heraus, dass der praktische Einsatz solcher Proteine, z.B. in der Diagnostik, der Therapie und bei Biotransformationen, häufig auf Schwierigkeiten stößt, da deren Stabilitäts- und Löslichkeitseigenschaften, insbesondere bei physiologischen pH-Werten, oft unbefriedigend sind. Zwei Beispiele für solche Proteine sind der Tumornekrosefaktor TNF- α oder Interleukin-2.

Löslichkeitsprobleme treten zudem sehr häufig bei der Expression von Glycoproteinen in prokaryotischen Systemen wie *E. coli* auf, da diese dann ohne die natürliche Glycosylierung exprimiert werden, was zum Teil eine erheblich verminderte Löslichkeit zur Folge hat. Dies kann den Einsatz von wesentlich teureren eukaryotischen Expressionssystemen erforderlich machen.

Beim therapeutischen Einsatz im Körper werden viele Proteine sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt oder abgebaut. Systemisch applizierte Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als etwa 70 kD können durch das reticuloendotheliale System oder spezifische Wechselwirkungen mit zellulären Rezeptoren dem Kreislauf entzogen werden. Kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 70 kD können überdies in großem Umfang durch die glomeruläre Filtration in der Niere (Ausschlußgrenze etwa 70 kD) entfernt werden.

Ein in jüngerer Zeit verfolgter Ansatz zur Behebung der geschilderten Probleme besteht in der Kopplung solcher problematischen Proteine mit gut wasserlöslichen biokompatiblen Polymeren, wie z.B. Polyethylenglycol und Dextran. Durch die Kopplung läßt sich einerseits das Molekulargewicht über den Schwellenwert von 70 kD hinaus erhöhen, so dass die Plasma-Verweilzeit kleinerer Proteine drastisch

gesteigert werden kann, andererseits kann durch den hydrophilen Polymeranteil die Löslichkeit im wäßrigen Milieu verbessert werden.

Weitere, meist günstige Wirkungen, die mit der Kopplung von Proteinen mit solchen Polymeren verbunden sein können, beruhen auf der Maskierung von Protease-erkennungsstellen und antigenen Determinanten auf dem Proteinmolekül durch das gebundene Polymer. Dadurch können die therapeutischen Proteine zum einen weitgehend dem proteolytischen Abbau entzogen werden, zum anderen ist die Auslösung allergener Reaktionen durch das körperfremde therapeutische Protein weitgehend unterdrückt. Über die Molekulargewichtserhöhung hinaus werden Proteine so durch die Anwesenheit eines Polymers vor enzymatischem Abbau und zudem oft vor thermischer Denaturierung geschützt. In vielen Fällen erhöht sich dadurch die Stabilität und *in vivo*-Halbwertszeit der Proteine deutlich bzw. sinkt die Immunogenität und Antigenität.

Bisher wurden die meisten Modifizierungen mit Polyethylenglycol oder Dextran durchgeführt, wobei PEG generell bevorzugt wird, da es einfachere Produkte ergibt.

Dextran-Kopplungen wurden nur für einige wenige Proteine beschrieben, wie z.B. Streptokinase, Plasmin, Hämoglobin oder Aprotinin. Dextran-Konjugate zeigen jedoch oft hohe Allergenität, vermutlich verursacht durch Abbauprodukte des Dextrans, eine geringe metabolische Stabilität und in vielen Fällen geringe Ausbeuten bei den Kopplungsreaktionen. Dies hat dazu geführt, dass bisher keines dieser Dextran-Kopplungsprodukte für die therapeutische Anwendung an Mensch oder Tier zugelassen wurde.

Derivatisierungen mit PEG wurden wesentlich häufiger durchgeführt, so dass diese Methode heute als Standard für die Molekulargewichtsvergrößerung von Proteinen angesehen werden kann. Einige dieser Derivate befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Versuche bzw. sind bereits in den USA zugelassen. In Phase III befindet sich PEG-Hämoglobin sowie ein PEG-Addukt der Superoxiddismutase (SOD), das hinsichtlich Polymerkopplungen als das am besten untersuchte Protein gilt. PEG-gekoppelte Asparaginase wird bereits in der Therapie der akuten

lymphozytischen Leukämie eingesetzt. In 2001 wurde PEG-Interferon- α zur Behandlung von Hepatitis-C-Patienten zugelassen.

Beim Einsatz dieser PEG-Konjugate wurde jedoch auch über unangenehme bis gefährliche Nebenwirkungen wie Juckreiz, Überempfindlichkeitsreaktionen und Pankreatitis berichtet. Ferner ist die biologische Aktivität der Proteine nach der PEG-Kopplung oft sehr gering und der Metabolismus der Abbauprodukte von PEG-Konjugaten ist noch weitgehend unbekannt und stellt möglicherweise ein Gesundheitsrisiko dar.

WO 99/49897 beschreibt Konjugate von Hämoglobin, welche durch Umsetzung der Aldehydgruppen von oxidativ ringgeöffneten Polysacchariden wie Hydroxyethylstärke oder Dextran mit primären Amingruppen des Proteins gebildet werden. Dabei wirken die eingesetzten Polysaccharide jedoch als polyfunktionelle Reagenzien, die ein sehr heterogenes Produktgemisch mit schwer einstellbaren Eigenschaften ergeben.

US-Patent 6,083,909 beschreibt ein Verfahren zur Kopplung von selektiv oxidierte Hydroxyethylstärke an Hämoglobin in DMSO. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, daß das gewünschte Produkt unter den angegebenen Bedingungen nicht erhalten wird, da Hämoglobin in DMSO denaturiert und damit seine biologische Aktivität verliert.

Es besteht somit nach wie vor Bedarf an physiologisch gut verträglichen Alternativen zu Dextran- oder PEG-gekoppelten Proteinen, mit denen die Löslichkeit von Proteinen verbessert oder die Verweildauer der Proteine im Plasma erhöht werden kann.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, solche Alternativen bereitzustellen und einfache und effiziente Verfahren zur Herstellung solcher alternativer Proteinderivate zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugate gelöst, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die bindende Wechselwirkung

zwischen dem Hydroxyalkylstärkemolekül und dem Protein auf einer kovalenten Bindung beruht, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins ist, wobei die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion zur obengenannten kovalenten Bindung modifiziert sein kann.

Die Erfindung umfasst ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, welche diese Konjugate enthalten, sowie die Verwendung dieser Konjugate und Zusammensetzungen zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers sowie Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate und Zusammensetzungen.

Überraschend wurde gefunden, dass sich die oben beschriebenen Reaktionen bei geeigneter Wahl der Bedingungen in wässriger Lösung durchführen lassen, wodurch die biologische Aktivität der Proteine in vielen Fällen vollständig oder teilweise erhalten werden kann.

Das wässrige Reaktionsmedium für die Kopplungsreaktion ist dabei vorzugsweise Wasser oder eine Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, wobei der Wasseranteil in der Mischung mindestens etwa 70 Gew.-%, vorzugsweise mindestens etwa 80 Gew.-%, noch bevorzugter mindestens etwa 90 Gew.-% beträgt.

Das Molverhältnis von Hydroxyalkylstärke (HAS) zu Protein bei der Kopplungsreaktion beträgt gewöhnlich etwa 20:1 bis 1:1, vorzugsweise etwa 5:1 bis 1:1.

Die biologische Restaktivität der erfindungsgemäßen Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugate, bezogen auf die Ausgangsaktivität des Proteins, beträgt in der Regel mindestens 40%, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 %.

Die erfindungsgemäß eingesetzte Hydroxyalkylstärke (HAS) kann nach einem bekannten Verfahren, z.B. Hydroxyalkylierung von Stärke an der C₂- und/oder C₆-Position der Anhydroglucoseeinheiten mit Alkylenoxid oder 2-Chloralkanol, z.B. 2-Chlorethanol, (siehe z.B. US 5,218,108 für die Hydroxyethylierung von Stärke), mit verschiedenen gewünschten Molekulargewichtsbereichen und Substitutionsgraden hergestellt werden. Es können auch beliebige der im Handel erhältlichen Präparationen eingesetzt werden. Die Definition der Alkylgruppierung in „Hydroxyalkylstärke“, wie hier verwendet, schließt Methyl, Ethyl, Isopropyl und n-Propyl ein, wobei Ethyl besonders bevorzugt ist. Ein wesentlicher Vorteil der HES ist es, dass diese als biokompatibler Plasmaexpander bereits behördlich zugelassen ist und in großem Stil klinisch eingesetzt wird.

Das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyalkylstärke kann im Bereich von etwa 3 kD bis mehreren Millionen Dalton, vorzugsweise etwa 4 kD bis etwa 1000 kD, bevorzugter im Bereich von etwa 4 kD bis etwa 50 kD oder im Bereich von etwa 70 kD bis etwa 1000 kD, besonders bevorzugt bei etwa 130 kD, liegen. Für die Kopplung an kleine Proteine wird das mittlere Molekulargewicht der Hydroxyalkylstärke vorzugsweise so gewählt, daß der oben genannte Schwellenwert von 70 kD bei den Konjugaten überschritten wird, während für die Kopplung an große Proteine das Molekulargewicht der Hydroxyalkylstärke vorzugsweise im unteren Bereich des genannten Spektrums liegen wird. Da eine Kopplung an mehreren Stellen eines Proteins möglich ist, kann es auch vorteilhaft sein, mehrere kleine Polymerketten, statt einer hochmolekularen zu koppeln. Der Substitutionsgrad (Verhältnis der Anzahl modifizierter Anhydroglucoseeinheiten zur Anzahl der gesamten Anhydroglucoseeinheiten) kann ebenfalls variieren und wird häufig im Bereich von etwa 0,2 bis 0,8, vorzugsweise etwa 0,3 bis 0,7, noch bevorzugter etwa 0,5, liegen. (Anmerkung: Die Zahlen beziehen sich auf den "Degree of Substitution", der zwischen 0 und 1 liegt). Das Verhältnis von C₂- zu C₆-Substitution liegt gewöhnlich im Bereich von 4 bis 16, vorzugsweise im Bereich von 8 bis 12.

Diese Parameter lassen sich nach bekannten Verfahren einstellen. Erfahrungen mit der Verwendung von Hydroxyethylstärke (HES) als Blutersatzstoff haben gezeigt, dass die Verweilzeit von HES im Plasma vom Molekulargewicht und dem

Substitutionsgrad und Substitutionstyp (C_2 -Substitution oder C_6 -Substitution) abhängt, wobei ein höheres Molekulargewicht, ein höherer Substitutionsgrad und ein höherer Anteil der C_2 -Substitution die Verweilzeit erhöht.

Diese Beziehungen gelten auch für die erfindungsgemäßen Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugate, so dass die Verweilzeit eines bestimmten Konjugats im Plasma über den Polysaccharidanteil einstellbar ist.

Hydroxyethylstärke-Präparate mit einem mittleren Molekulargewicht von 130 kD und einem Substitutionsgrad von 0,5 bzw. mit einem mittleren Molekulargewicht von 200 kD und einem Substitutionsgrad von 0,25 fanden bereits klinische Anwendung als Blutersatzstoffe und sind auch für den Einsatz in der vorliegenden Erfindung geeignet.

Als Protein ist in der vorliegenden Erfindung grundsätzlich jedes Protein geeignet, das die erforderliche funktionelle Gruppe, z.B. eine freie Aminogruppe, Thiolgruppe oder Carboxylgruppe, zur Reaktion mit der funktionellen Gruppe des HAS-Moleküls besitzt.

Zur Einführung einer gewünschten funktionellen Gruppe kann das Protein auch mit einem geeigneten, physiologisch verträglichen, bifunktionellen Linkermolekül umgesetzt werden. Die verbleibende reaktionsfähige funktionelle Gruppe des angekoppelten Linkermoleküls wird dann für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ebenfalls als „reaktionsfähige funktionelle Gruppe des Proteins“ betrachtet.

Geeignete Linkermoleküle enthalten an einem Ende eine Gruppierung, die mit einer reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins, z.B. einer Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann, und am anderen Ende eine Gruppierung, die mit der endständigen Aldehydgruppe oder einer daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe, z.B. einer Carboxylgruppe, aktivierten Carboxylgruppe, Amino- oder Thiolgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann. Zwischen den beiden funktionellen Gruppen des Linkermoleküls befindet sich ein biologisch verträgliches Brückenmolekül geeigneter

Länge, z.B. eine Gruppierung, die sich von einem Alkan ableitet, eine (Oligo)alkylen-glycolgruppierung oder eine andere geeignete Oligomergruppierung. Bevorzugte Gruppierungen, die mit Aminogruppen reagieren können, sind z.B. N-Hydroxy-succinimidester, Sulfo-N-hydroxysuccinimidester, Imidoester und andere aktivierte Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Thiolgruppen reagieren können, sind z.B. Maleimid- und Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Aldehyd- oder Carboxylgruppen reagieren können, sind z.B. Amino- oder Thiolgruppen.

Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von SH- und NH-Funktionen sind:

AMAS	(N- α (Maleimidoacetoxy)succinimidester)
BMPS	(N- β (Maleimidopropoxy)succinimidester)
GMBS	(N- γ (Maleimidobutyroxy)succinimidester)
EMCS	(N- ϵ (Maleimidocaproxy)succinimidester)
MBS	(m-(Maleimidobenzoyl)-N-hydroxysuccinimidester)
SMCC	(Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat)
SMPB	(Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat)
SPDP	(Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat)
Sulfo-GMBS	(N- γ (Maleimidobutyroxy)sulfosuccinimidester)
Sulfo-EMCS	(N- ϵ (Maleimidocaproxy)sulfosuccinimidester).

Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von SH- und SH-Funktionen sind:

BMB	(1.4-Bis-maleimidobutan)
BMDB	(1.4-Bis-maleimido-2.3-dihydroxybutan)
BMH	(Bis-maleimidohexan)
BMOE	(Bis-maleimidoethan)
DTME	(Dithio-bis-maleimidoethan)
HBVS	(1.6-Hexan-bis-vinylsulfon)
BM(PEO) ₃	(1.8-Bis-maleimidotriethylenglycol)
BM(PEO) ₄	(1.11-Bis-maleimidotetraethylenglycol).

Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von NH- und NH-Funktionen sind:

BSOCOES	(Bis-(2-(succinimidyloxycarbonyloxy)ethyl)sulfon)
---------	---

BS ³	(Bis-(sulfosuccinimidyl)suberat)
DFDNB	(1.5-Difluor-2.4-dinitrobenzol)
DMA	(Dimethyladipimidat HCl)
DSG	(Disuccinimidylglutarat)
DSS	(Disuccinimidylsuberat)
EGS	(Ethylenglycol-bis-(succinimidylsuccinat)).

Beispielhafte Linkermoleküle zur Verknüpfung von SH- und CHO-Funktionen sind:

BMPH	(N-(β -Maleimidopropionsäure)hydrazid TFA)
EMCA	(N-(ϵ -Maleimidocaprionsäure)hydrazid)
KMUH	(N-(κ -Maleimidoundecansäure)hydrazid)
M ₂ C ₂ H	(4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylhydrazid HCl)
MPBH	(4-(4-N-Maleimidophenyl)buttersäurehydrazid HCl)
PDPH	(3-(2-Pyridyldithio)propionylhydrazid).

Ein beispielhaftes Linkermolekül zur Verknüpfung von SH- und OH-Funktionen ist PMPI (N-(p-Maleimidophenyl)isocyanat).

Beispielhafte Linkermoleküle zur Überführung einer SH-Funktion in eine COOH-Funktion sind:

BMPA	(N- β -Maleimidopropionsäure)
EMCH	(N- β -Maleimidocaprionsäure)
KMUA	(N- κ -Maleimidoundecansäure).

Beispielhafte Linkermoleküle zur Überführung einer NH-Funktion in eine COOH-Funktion sind MSA (Methyl-N-succinimidyladipat) oder längerkettige Homologe davon oder entsprechende Derivate von Ethylenglycol.

Beispielhafte Linkermoleküle zur Überführung einer COOH-Funktion in eine NH-Funktion sind DAB (1.4-Diaminobutan) oder längerkettige Homologe davon oder entsprechende Derivate von Ethylenglycol.

Ein beispielhaftes Linkermolekül, das mit einer Aminogruppe eines Moleküls reagiert und eine geschützte Aminogruppe in größerem Abstand von diesem Molekül zur Vermeidung einer sterischen Hinderung bereitstellt, ist TFCS (N- ϵ (Trifluoracetyl-caproyloxy)succinimidester).

Weitere geeignete Linkermoleküle sind Fachleuten bekannt und im Handel erhältlich oder können je nach Bedarf und in Abhängigkeit von den vorhandenen und gewünschten funktionellen Gruppen der HAS und des anzukoppelnden Proteins entworfen und nach bekannten Verfahren hergestellt werden.

Der Begriff „Protein“ im Sinne der vorliegenden Erfindung soll jede Aminosäuresequenz einschließen, die mindestens 9-12 Aminosäuren, vorzugsweise mindestens 15 Aminosäuren, bevorzugter mindestens 25 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren, umfaßt, und auch natürliche Derivate, z.B. Prä- oder Pro-Formen, Glycoproteine, Phosphoproteine, oder synthetische modifizierte Derivate, z.B. Fusionsproteine, Neoglycoproteine, oder durch gentechnologische Verfahren modifizierte Proteine, z.B. Fusionsproteine, Proteine mit Aminosäureaustauschen zur Einführung bevorzugter Kopplungsstellen, einschließen.

Zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers wird das betreffende Protein eine bestimmte gewünschte Funktion im Körper ausüben. Vorzugsweise besitzt das Protein daher z.B. eine regulatorische oder katalytische Funktion, eine Signalvermittlungs- oder Transportfunktion oder eine Funktion bei der Immunreaktion oder Auslösung einer Immunreaktion.

Das Protein kann beispielsweise aus der Gruppe aus Enzymen, Antikörpern, Antigenen, Transportproteinen, Bioadhäsionsproteinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Rezeptoren, Suppressoren, Aktivatoren, Inhibitoren oder einem funktionellen Derivat oder Fragment davon ausgewählt sein. „Funktionelles Derivat oder Fragment“ bedeutet in diesem Zusammenhang ein Derivat oder Fragment, das eine gewünschte biologische Eigenschaft oder Aktivität des Stammoleküls ganz oder teilweise, z.B. zu mindestens 10-30 %, bevorzugter zu mehr als 50 %, noch bevorzugter zu mehr als 70 %, am meistens bevorzugt zu mehr als 90%, behalten

hat. Besonders bevorzugte Beispiele eines solchen Fragments sind Antikörperfragmente.

Spezielle Beispiele sind α -, β - oder γ -Interferon, Interleukine, z.B. IL-1 bis IL-18, Wachstumsfaktoren, z.B. epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Thrombozytenwachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Gehirn-abgeleiteter Wachstumsfaktor (BDGF), Nervenwachstumsfaktor (NGF), B-Zellen-Wachstumsfaktor (BCGF), Gehirn-abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor (BDNF), Ciliärer neurotropher Faktor (CNTF), transformierende Wachstumsfaktoren, z. B. TGF- α oder TGF- β , Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), z.B. GM-CSF, G-CSF, BMP („bone morphogenic proteins“), Wachstumshormone, z.B. Human-Wachstumshormon, Tumornekrosefaktoren, z.B. TNF- α oder TNF- β , Somatostatin, Somatotropin, Somatomedine, Serumproteine, z.B. die Gerinnungsfaktoren II-XIII, Albumin, Erythropoietin, Myoglobin, Hämoglobin, Plasminogenaktivatoren, z.B. Gewebe-Plasminogenaktivator, Hormone oder Prohormone, z.B. Insulin, Gonadotropin, Melanocyten-stimulierendes Hormon (α -MSH), Triptorelin, Hypothalamushormone z.B. antidiuretische Hormone (ADH) und Oxytocin sowie Liberine und Statine, Parathormon, Schilddrüsenhormone, z.B. Thyroxin, Thyrotropin, Thyroliberin, Prolactin, Calcitonin, Glucagon, Glucagon-ähnliche Peptide (GLP-1, GLP-2 etc.), Exendine, z.B. Exendin-4, Leptin, Vasopressin, Gastrin, Secretin, Integrine, Glycoproteinhormone (z.B. LH, FSH etc.), Pigmenthormone, Lipoproteine und Apo-Lipoproteine, z.B. Apo-B, Apo-E, Apo-L_a, Immunglobuline, z.B. IgG, IgE, IgM, IgA, IgD oder ein Fragment davon, Hirudin, „Tissue-Pathway“-Inhibitor, Pflanzenproteine, z.B. Lektin oder Ricin, Bienengift, Schlangengifte, Immunotoxine, Antigen E, Butiroxobina, Alpha-Proteinase-Inhibitor, Ragweed-Allergen, Melanin, Oligolysin-Proteine, RGD-Proteine oder gegebenenfalls entsprechende Rezeptoren für eines dieser Proteine; oder ein funktionelles Derivat oder Fragment eines dieser Proteine oder Rezeptoren.

Geeignete Enzyme können z.B. aus den Gruppen der kohlenhydratspezifischen Enzyme, proteolytischen Enzyme, Oxidasen, Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Kinasen und Ligasen ausgewählt sein. Spezielle, nicht beschränkende Beispiele sind Asparaginase, Arginase, Arginindeaminase,

Adenosindeaminase, Glutaminase, Glutaminase-Asparaginase, Phenylalanin-ammoniumlyase, Tryptophanase, Tyrosinase, Superoxiddismutase, eine Endotoxinase, eine Catalase, Peroxidase, Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Thermolysin, eine Lipase, eine Uricase, Adenosindiphosphatase, Purinnukleosidphosphorylase, Bilirubinoxidase, eine Glucoseoxidase, Glucodase, Gluconatoxidase, Galaktosidase, Glucocerebrosidase, Glucuronidase, Hyaluronidase, Gewebefaktor, ein Gewebeplasminogenaktivator, Streptokinase, Urokinase, MAP-Kinasen, DNAsen, RNAsen, Lactoferrin, und funktionelle Derivate oder Fragmente davon.

Wie oben erwähnt, ist die an der Kopplungsreaktion beteiligte funktionelle Gruppe des HAS-Moleküls die endständige Aldehydgruppe oder eine daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangene Gruppe.

Ein Beispiel für eine solche chemische Umsetzung ist die selektive Oxidation dieser Aldehydgruppe mit einem schonenden Oxidationsmittel, wie z.B. Iod, Brom oder einigen Metallionen, oder auch mittels elektrochemischer Oxidation zu einer Carboxylgruppe oder aktivierten Carboxylgruppe, z.B. einem Ester, Lacton, Amid, wobei die Carboxylgruppe gegebenenfalls in einer zweiten Reaktion in das aktivierte Derivat überführt wird. Diese Carboxylgruppe oder aktivierte Carboxylgruppe kann dann mit einer primären Amino- oder Thiolgruppe des Proteins unter Ausbildung einer Amidbindung oder Thioesterbindung gekoppelt werden.

In einem besonders bevorzugten Herstellungsverfahren wird diese Aldehydgruppe mit einem molaren Überschuß an Iod, vorzugsweise in einem Molverhältnis von Iod zu HAS von 2:1 bis 20:1, besonders bevorzugt etwa 5:1 bis 6:1, in wäßriger basischer Lösung selektiv oxidiert. Nach dem in Beispiel 1 beschriebenen optimierten Verfahren wird zunächst eine Menge an Hydroxyalkylstärke in warmem destilliertem Wasser gelöst und etwas weniger als 1 Moläquivalent wäßriger Iodlösung, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,05-0,5 N, besonders bevorzugt etwa 0,1 N, zugegeben. Danach wird eine wäßrige NaOH-Lösung in einer molaren Konzentration, die etwa das 5-15fache, vorzugsweise etwa das 10fache, der Iodlösung beträgt, langsam tropfenweise in Abständen von mehreren Minuten der Reaktionslösung zugegeben, bis die Lösung nach der Zugabe beginnt, wieder klar zu

werden. Es wird erneut etwas weniger als 1 Moläquivalent der obigen wäßrigen Iodlösung der Reaktionslösung zugegeben, das Zutropfen der NaOH-Lösung wieder aufgenommen und die Zugabe von Iod und NaOH werden solange wiederholt, bis etwa 5,5-6 Moläquivalente Iodlösung und 11-12 Moläquivalente NaOH-Lösung, bezogen auf die Hydroxyalkylstärke, zugegeben worden sind. Dann wird die Reaktion abgebrochen, die Reaktionslösung entsalzt, z.B. durch Dialyse oder Ultrafiltration, einer Kationenaustauschchromatographie unterworfen und das Reaktionsprodukt durch Lyophilisierung gewonnen. Bei diesem Verfahren werden unabhängig vom Molekulargewicht der HAS fast quantitative Ausbeuten erzielt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die selektive Oxidation mit alkalischen stabilisierten Lösungen von Metallionen, z.B. Cu^{++} oder Ag^+ , ebenfalls in etwa quantitativer Ausbeute (Beispiel 2). Vorzugsweise wird dabei ein etwa 3-10facher molarer Überschuß des Oxidationsmittels eingesetzt.

Anschließend wird die gebildete selektiv oxidierte Hydroxyalkylstärke (ox-HAS) in Gegenwart eines Aktivierungsreagenzes mit einer freien Aminogruppe des gewünschten Proteins unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt. Geeignete Aktivierungsreagenzien sind z.B. N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, Thiophenol, p-Nitrophenol, o,p-Dinitrophenol, Trichlorphenol, Trifluorphenol, Pentachlorphenol, Pentafluorphenol, 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt), HOObt, HNSA, 2-Hydroxypyridin, 3-Hydroxypyridin, 3,4-Dihydro-4-oxobenzotriazin-3-ol, 4-Hydroxy-2,5-diphenyl-3(2H)-thiophenon-1,1-dioxid, 3-Phenyl-1-(p-nitrophenyl)-2-pyrazolin-5-on, [1-Benzotriazolyl-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat] (BOP), [1-Benzotriazolyl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat] (PyBOP), [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat] (HBTU), [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluorborat] (TBTU), [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(pentamethylen)uroniumhexafluorophosphat], [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetramethylen)uroniumhexafluorophosphat], Carbonyldiimidazol (CDI), oder vorzugsweise Carbodiimide, z. B. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIPC), besonders bevorzugt EDC. Im Gegensatz zu gängigen, in der Literatur beschriebenen Verfahren für ähnliche Kopplungsreaktionen

wurde dabei überraschenderweise festgestellt, dass bei Verwendung eines Carbo-diimids in der Regel der Einsatz ansonsten obligatorischer weiterer Aktivatoren wie Triazole, z. B. HOBt, nicht erforderlich ist bzw. sogar die Ausbeuten verschlechtert. Bei der erfindungsgemäßen Kopplung von ox-HES an verschiedene Modellverbindungen in Gegenwart von EDC und Abwesenheit von HOBt konnten dagegen weitgehend unabhängig vom Molekulargewicht der HES hohe Ausbeuten erzielt werden (siehe Beispiele).

Statt der Reaktion der Carboxylgruppe oder aktivierten Carboxylgruppe mit einer freien primären Aminogruppe des Proteins (z.B. eines Lysin- oder Argininrests) ist grundsätzlich auch eine analoge Reaktion mit einer Thiolgruppe (eines Cysteins) des Proteins möglich. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Cysteine in der Regel in S-S-Brücken involviert sind und daher für eine Kopplungsreaktion nicht zur Verfügung stehen. Sind dagegen freie Cysteine vorhanden, so spielen diese häufig eine wichtige Rolle bei der Katalyse oder sind in der Kontaktstelle von Untereinheiten involviert. Eine Modifizierung dieser Cysteine wird dann in einem teilweisen oder vollständigen Verlust der biologischen Aktivität resultieren. Zur Behebung dieses Problems könnten freie Cysteine durch gängige gentechnologische Verfahren wie z.B. gerichtete Mutagenese oder chemische Peptidsynthese an solchen Stellen im Protein eingeführt werden, von denen bekannt ist, dass sie keine Rolle für die Aktivität spielen. Auf diese Weise ist eine optimale Steuerung des Kopplungsortes möglich. Auf dieselbe Weise könnten auch andere reaktionsfähige Aminosäuren, z.B. Lys, His, Arg, Asp, Glu, gezielt in das Protein eingeführt werden.

Die reaktive Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls kann auch eine durch chemische Umsetzung der endständigen Aldehydgruppe entstandene Amino- oder Thiolgruppe sein. Beispielsweise kann eine reduktive Aminierung der Aldehydgruppe durch Reaktion mit Ammoniak in Gegenwart von Wasserstoff und einem Katalysator oder in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid durchgeführt werden. Die entstandene Amino- oder Thiolgruppe kann dann mit einer freien Carboxylgruppe des Proteins (z.B. einer gegebenenfalls aktivierten Glutamin- oder Asparaginsäure) unter Ausbildung einer Amid- oder Thioesterbindung reagieren.

Ferner kann die endständige Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls oder eine daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangene funktionelle Gruppe auch mit einem geeigneten physiologisch verträglichen, bifunktionellen Linkermolekül umgesetzt werden. In diesem Falle ist für die Kopplungsreaktion die „aus der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls durch chemische Umsetzung hervorgegangene funktionelle Gruppe“ die verbleibende reaktionsfähige funktionelle Gruppe des bifunktionellen Linkermoleküls, mit dem die endständige Aldehydgruppe oder die daraus hervorgegangene funktionelle Gruppe umgesetzt wurde. Auf diese Weise kann die endständige Aldehydgruppe ebenfalls in eine gewünschte funktionelle Gruppe überführt werden.

Geeignete Linkermoleküle enthalten an einem Ende eine Gruppierung, die mit der endständigen Aldehydgruppe oder einer daraus durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe, z.B. einer Carboxylgruppe, aktivierten Carboxylgruppe, Amino- oder Thiolgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann, und am anderen Ende eine Gruppierung, die mit einer reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins, z.B. einer Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppe, eine kovalente Bindung eingehen kann. Zwischen den beiden funktionellen Gruppen des Linkermoleküls befindet sich ein biologisch verträgliches Brückenmolekül geeigneter Länge, z.B. eine Gruppierung, die sich von einem Alkan ableitet, eine (Oligo)alkylen-glycolgruppierung oder eine andere geeignete Oligomergruppierung. Bevorzugte Gruppierungen, die mit Aminogruppen reagieren können, sind z.B. N-Hydroxy-succinimidester, Sulfo-N-hydroxysuccinimidester, Imidoester oder andere aktivierte Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Thiolgruppen reagieren können, sind z.B. Maleimid- und Carboxylgruppen; bevorzugte Gruppierungen, die mit Aldehyd- oder Carboxylgruppen reagieren können, sind z.B. Amino- oder Thiolgruppen.

Eine Reihe von speziellen, nicht beschränkenden Beispielen für geeignete Linkermoleküle wurden bereits oben unter Bezug auf die Konjugation von Linkermolekülen an das Protein angegeben.

Bei einem alternativen erfindungsgemäßen Kopplungsverfahren der vorliegenden Erfindung wird die endständige Aldehydgruppe direkt mit einer primären Aminogruppe (z.B. eines Lysin- oder Argininrests oder des N-Terminus) des Proteins unter Bildung einer Schiff'schen Base umgesetzt. Anschließend oder parallel dazu wird die gebildete Schiff'sche Base durch Umsetzung mit einem geeigneten Reduktionsmittel reduziert, wodurch eine im wässrigen Milieu stabile Bindung zwischen Protein und HAS entsteht. Bevorzugte Reduktionsmittel sind Natriumborhydrid, Natriumcyano-borhydrid, organische Borkomplexe, z.B. ein 4-(Dimethylamino)pyridin-Borkomplex, N-Ethyl-diisopropylamin-Borkomplex, N-Ethylmorpholin-Borkomplex, N-Methylmorpholin-Borkomplex, N-Phenylmorpholin-Borkomplex, Lutidin-Borkomplex, Triethylamin-Borkomplex, Trimethylamin-Borkomplex; geeignete stereoselektive Reduktionsmittel sind beispielsweise Natriumtriacetatborhydrid, Natriumtriethylborhydrid, Natriumtrimethoxyborhydrid, Kalium-tri-sec-butylborhydrid (K-Selectride), Natrium-tri-sec-butylborhydrid (N-Selectride), Lithium-tri-sec-butylborhydrid (L-Selectride), Kaliumtriämylborhydrid (KS-Selectride) und Lithiumtriämylborhydrid (LS-Selectride).

Durch geeignete Variation der Reaktionsbedingungen können die Ausbeuten verbessert werden. Parameter für solche Optimierungsversuche sind der pH-Wert des Reaktionsansatzes (möglicher Proteinabbau durch alkalisches Borhydrid), Temperatur und Dauer der Inkubation sowie Art des Reduktionsmittels für die Eintopfreaktion. Eine weitere Alternative stellt die Möglichkeit dar, die Reaktion in zwei Schritten durchzuführen, wobei für den Reduktionsschritt ein immobilisiertes Reduktionsmittel eingesetzt werden kann.

Die Reaktionsprodukte der Kopplung können mit bekannten Verfahren untersucht und die Kopplungseffizienz festgestellt werden. So können z.B. die freien primären Aminogruppen im Protein vor und nach der Kopplung mit Trinitrobenzolsulfonsäure (Habeeb, ASAF, Anal. Biochem. **14**, 328-336 (1966)) bestimmt werden. Die Kopplungsausbeute von Reaktionen unter Beteiligung primärer Amine könnte auch durch Derivatisierung der nicht-umgesetzten Amine mit Fluorescamin und Bestimmung der Fluoreszenz festgestellt werden. Die Molekulargewichtsverteilung kann durch SDS-PAGE und Gelpermeation festgestellt werden. Der Proteinanteil im

Konjugat ist durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung nachzuweisen, während der Saccharidanteil durch eine Glykan-spezifische Färbung der mittels SDS-PAGE getrennten Banden nach Blotting auf eine Membran feststellbar ist. Auch eine quantitative Glykanbestimmung ist möglich. Eine genaue Identifizierung der Kopplungsstelle auf dem Protein ist durch Peptid-Mapping und/oder MALDI-TOF-Massenspektroskopie bzw. Elektrosprayionisation-Massenspektroskopie möglich. Auf diese Weise kann die Kopplung optimiert und die Molekulargewichtsverteilung sowie möglicherweise (z.B. bei unterschiedlicher Reaktivität der reaktionsfähigen Gruppen auf dem Protein) sogar die Kopplungsstelle der Produkte vorbestimmt werden.

Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können gegebenenfalls als solche oder in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers eingesetzt werden.

Derartige Zusammensetzungen umfassen eine pharmazeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen Konjugats als aktiven Bestandteil sowie einen pharmazeutisch geeigneten Träger und gegebenenfalls andere therapeutische bzw. galenische Bestandteile oder Hilfsstoffe. Hilfsstoffe können z.B. Verdünnungsmittel, Puffer, Geschmacksmittel, Bindemittel, oberflächenaktive Mittel, Verdickungsmittel, Gleitmittel, Konservierungsstoffe (einschließlich Antioxidantien) sowie Substanzen einschließen, die dazu dienen, die Formulierung mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers isotonisch zu machen. Eine pharmazeutisch wirksame Menge ist diejenige Menge, welche ausreicht, um bei einmaliger oder mehrmaliger Verabreichung im Rahmen einer Behandlung zur Erleichterung, Heilung oder Verhütung eines Krankheitszustands eine gewünschte positive Wirkung zu entfalten. Ein pharmazeutisch annehmbarer Träger ist ein Träger, der sowohl mit dem Arzneimittelwirkstoff als auch mit dem Körper des Patienten kompatibel ist.

Die Form der Zusammensetzung wird je nach dem gewünschten bzw. geeigneten Verabreichungsweg variieren. Ein bevorzugter Weg ist die parenterale Verabreichung, z.B. eine subkutane, intramuskuläre, intravenöse, intraarterielle, intraartikuläre, intra-

thekale, extradurale Injektion bzw. gegebenenfalls Infusion. Ebenfalls möglich ist eine intranasale, intratracheale oder topische Applikation. Eine topische Applikation von erfindungsgemäß konjugierten Wachstumsfaktoren könnte beispielsweise die Wundheilung beschleunigen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können günstigerweise in Form einer Dosierungseinheit dargeboten werden und nach irgendeinem der auf dem Gebiet der Pharmazie wohlbekannten Verfahren hergestellt werden.

Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können auch auf allen anderen Gebieten eingesetzt werden, bei denen andere Protein-Polymer-Konjugate, z. B. PEG-Protein-Konjugate, zur Anwendung kamen. Einige spezielle, nicht beschränkende Beispiele sind die Verwendung eines HAS-Protein-Konjugats als immobilisierter Katalysator oder Reaktionspartner für eine Reaktion in heterogener Phase oder als Säulenmaterial für die (Immun)affinitätschromatographie. Weitere Anwendungsmöglichkeiten werden für den Fachmann in Kenntnis der hier offenbarten Eigenschaften der erfindungsgemäßen HAS-Protein-Konjugate unschwer ersichtlich sein.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne diese jedoch darauf zu beschränken. Insbesondere können analoge Reaktionen auch mit Hydroxymethylstärke und Hydroxypropylstärke durchgeführt und ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

BEISPIEL 1

Selektive Oxidation von Hydroxyethylstärke (HES) mit Iod

In einem Rundkolben wurden 10 g HES-130 kD in 12 ml entionisiertem Wasser unter Erwärmen gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2 ml einer I₂-Lösung (0.1 N) gegeben. Eine Pipette mit 2 ml 1.0 N NaOH wurde mit dem Kolben über ein 2-Wege-Verbindungsstück verbunden und die NaOH-Lösung mit ca. 1 Tropfen pro 4 Minuten zugetropft. Nach Zugabe von ungefähr 0.2 ml der NaOH-Lösung war die Lösung entfärbt, zu diesem Zeitpunkt wurde eine zweite Portion von 2 ml 0.1 N Iodlösung zugegeben. Die Reaktion war nach Zugabe von insgesamt 14 ml Iodlösung und 2.8 ml NaOH-Lösung beendet. Die Reaktionsmischung wurde anschließend gegen entionisiertes Wasser dialysiert.

Lactonisierung:

Die teilweise entsalzte Lösung wurde einer Chromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Amberlite IR-120, H^+ -Form) unterzogen, um die Aldonatgruppen in Aldonsäuregruppen umzuwandeln. Anschließend wurde das Wasser durch Lyophilisation entfernt und so die Lactonform erhalten. –

Bestimmung des Oxidationsgrades:

Zu jeweils 1 ml Probenlösung werden unter N_2 -Atmosphäre 1 ml alkalisches Kupferreagenz (3.5 g Na_2PO_4 , 4.0 g K-Na-Tatrat in 50 ml H_2O , dazu 10 ml 1 N NaOH, 8.0 ml 10%iger (Gew./Vol.) $CuSO_4$ -Lösung und 0.089 g K-Iodat in 10 ml H_2O , nach Zugabe von 18 g Na-Sulfat auf 100 ml auffüllen) pipettiert. Es wird 45 Minuten bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen werden 0.2 ml 2.5%iger KI-Lösung und 0.15 ml 1 M H_2SO_4 addiert. Nach 5 Min. wird mit 1 Tropfen Phenolrot-Indikatorlösung (1% Gew./Vol.) versetzt und mit 5 mM $Na_2S_2O_3$ -Lösung bis zum Verschwinden der Farbe titriert. Aus dem Verbrauch an Titrationsmittel läßt sich die Konzentration nichtumgesetzter Aldehydgruppen berechnen.

Es wurde eine annähernd quantitative Ausbeute erzielt (>98%). Hydroxyethylstärken mit höherer molarer Masse (z.B. 130 kD, 250 kD, 400 kD) konnten, genauso wie Hydroxyethylstärken mit niedrigerer molarer Masse (z.B. 10 kD, 25 kD, 40 kD), nach dieser Vorschrift in ähnlich hohen Ausbeuten oxidiert werden.

BEISPIEL 2**Selektive Oxidation von HES mit Cu^{2+} -Ionen**

Unter Erwärmen wurde eine Lösung von 0.24 mMol HES-130 kD in 10 ml entionisiertem Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde in einem 100-ml-Rundkolben auf eine Temperatur von 70-80 °C erhitzt und mit 1.17 mMol stabilisiertem Cu^{2+} (z.B. Rochelle-Salz als Stabilisator oder andere Stabilisatoren) und wässriger verd. NaOH-Lösung versetzt (Endkonzentration 0.1 N NaOH). Danach wurde die Temperatur auf 100 °C erhöht und die Reaktion solange laufen lassen, bis eine rötliche Farbe entstanden war. Die Reaktion wurde gestoppt und die Reaktionsmischung auf 4°C abgekühlt. Der rötliche Niederschlag wurde durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde gegen

entionisiertes Wasser dialysiert und anschließend wie in Beispiel 1 in das Lacton umgewandelt und lyophilisiert. Die Oxidation verlief quantitativ (Ausbeute >99%). Nach dieser Methode liessen sich auch niedermolekulare HES (z.B. HES-10 kD, HES-25 kD, HES-40 kD) und höhermolekulare HES-Spezies oxidieren.

BEISPIEL 3

Kopplung von selektiv oxidiertem hochmolekularem HES (ox-HES-130 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

In einem Rundkolben mit Magnetrührer wurden 4.3 g ox-HES-130 kD und 200 mg HSA (Sigma, Taufkirchen) unter leichtem Erwärmen vollständig in Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30 mg Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDC), gelöst in Wasser, zugegeben. Nach 2 h unter sehr mäßigem Rühren wurde eine zweite Portion von 30 mg EDC zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden unter sehr mäßigem Rühren wurde eine dritte Portion von 40 mg des Carbodiimids zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter diesen Bedingungen über Nacht belassen, 15 h lang gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert. Der Erfolg der Kopplung wurde mittels Gelpermeationschromatographie, SDS-PAGE und kohlenhydratspezifischer Färbung (Glyco-Dig-Kit von Roche-Boehringer, Basel) nach Blotting auf eine PVDF-Membran nachgewiesen. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt betrug ca. 90%.

BEISPIEL 4

Kopplung von selektiv oxidiertem niedermolekularem HES (ox-HES-10 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

In einem Rundkolben mit Magnetrührer wurden 7.4 g ox-HES-10 kD und 50 mg HSA vollständig in Wasser gelöst. Die Reaktion wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren für hochmolekulare HES durchgeführt, wobei insgesamt 282 mg EDC in drei Aliquots zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde ebenfalls dialysiert und lyophilisiert wie oben beschrieben. Die Analyse (wie oben) zeigte, dass Kopplungsprodukt erhalten wurde, jedoch waren die Ausbeuten etwas niedriger als bei der Kopplung mit hochmolekularem ox-HES.

BEISPIEL 5**Kopplung von ox-HES-130 kD an Myoglobin (Mb)**

4.3 g ox-HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (6-7 ml) gelöst und anschließend 100 mg Mb (Sigma, Taufkirchen), gelöst in 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0), zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 30 mg EDC gestartet. Die Zugabe von EDC wurde alle 2 Stunden wiederholt, bis insgesamt 90 mg des Carbodiimids verbraucht waren. Die Reaktionsmischung wurde anschließend gegen 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, dialysiert und lyophilisiert. Die GPC zeigte einen eindeutigen Produktpeak, der im Ausschlussvolumen bei 450 nm detektiert wurde. Aus diesem konnte eine Kopplungsausbeute von 88% berechnet werden. Die Sauerstoffbindungskapazität des hesylierten Myoglobins betrug ca. 76% der Bindungskapazität des unmodifizierten Mb.

BEISPIEL 6**Kopplung von ox-HES-10 kD an Superoxiddismutase (SOD)**

Ein Volumenteil einer wässrigen Lösung von ox-HES-10 kD (1.05 g/ml) wurde mit einem Volumenteil einer 7 mg/ml SOD-Lösung (Sigma, Taufkirchen) in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.6, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von 280 mg EDC in 5 Portionen über einen Zeitraum von 24 h initiiert. Der Reaktionsverlauf wurde durch GPC-Analytik in Phosphatpuffer und Detektion bei 280 nm verfolgt. Nach 24 h wurden 81% des Proteins im hochmolekularen Bereich der Trennsäule gefunden und die Reaktion nach dieser Zeit abgebrochen. Die Reaktionsmischung wurde einer Diafiltration mit einer 30-kD-Membran unterzogen und anschließend lyophilisiert. Massenspektrometrische Analyse des Produktes zeigte im Mittel ein molares Verhältnis von HES zu Protein von ca. 3:1.

BEISPIEL 7**Kopplung von ox-HES-130 kD an Streptokinase (SK)**

3.8 g ox-HES-130 kD wurden zusammen mit 35 mg Streptokinase (Sigma, Taufkirchen) in möglichst wenig 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.2, gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 46.5 mg EDC und 20 mg 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (HOBt)

zugegeben und Reaktion für insgesamt 24 h unter leichtem Rühren gehalten. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurden nach GPC-Analyse ca. 78% des Proteins als HES-Konjugat gefunden. In der SDS-PAGE war mit Silberfärbung eine deutliche Erhöhung der molaren Masse der Streptokinase zu beobachten. Parallel dazu konnten in der hochmolekularen Bande Kohlenhydrat-Strukturen mit der Digoxigenin-Methode eindeutig nachgewiesen werden.

BEISPIEL 8

Kopplung von ox-HES-130 kD an humanes Interleukin-2 (IL-2)

45 mg ox-HES-130 kD wurden in 0.5 ml 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6.5, unter leichtem Erwärmen vollständig gelöst. Nach Zugabe von 0.25 mg humanem IL-2 (Sigma, Taufkirchen), wodurch die Lösung opak wurde, wurde bei Raumtemperatur 4-6 h gerührt. Anschließend wurden 5 mg EDC in 4 Portionen mit jeweils 2 h Zeitdifferenz zugegeben und über Nacht weitergerührt, wobei eine klare Lösung entstand. Analyse mit GPC ergab ca. 65% Kopplungsausbeute.

BEISPIEL 9

Kopplung von ox-HES-25 kD an humanen Tumornekrosefaktor α (TNF α)

Zu 86 mg ox-HES-25 kD in ca. 0.4 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) wurden 0.3 mg hTNF α (Sigma, Taufkirchen) gegeben. Die trübe Lösung wurde für ca. 2 h gerührt bevor 1 mg EDC und 0.5 mg HOBt zugegeben wurden. Es wurde für ca. 6 h weitergerührt, wobei die Lösung im Laufe der Reaktionszeit klar wurde. Das Kopplungsprodukt wurde durch Ultrafiltration und Gefriertrocknung isoliert und mittels GPC und Detektion bei 280 nm analysiert. Dabei wurde eine Kopplungsausbeute von annähernd 74% gefunden.

BEISPIEL 10

Kopplung von ox-HES-130 kD an "Glucagon-like Peptide" (GLP-1)

In einem möglichst geringen Volumen Wasser wurden 7.4 g ox-HES-130 kD unter Erwärmen und leichtem Rühren gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 10 mg GLP-1 in der Amid-Form (Bachem, Schweiz) in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.4, pipettiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 35 mg EDC gestartet und für 2 h vorsichtig gerührt. Dies wurde noch 2x wiederholt, da nach dieser Zeit in der GPC-Analyse bei 280 nm kein Peptid-Peak mehr zu erkennen war, d.h., eine annähernd vollständige Umsetzung zum Kopplungsprodukt stattgefunden hatte. Dieses Kopplungsprodukt wurde mit einer 30 kD-Membran diafiltriert und aus Phosphatpuffer-Lösung lyophilisiert. Aus den Ergebnissen einer MALDI-Massenspektroskopie konnte auf eine 1:1-Stöchiometrie zwischen Peptid und HES geschlossen werden.

Beispiel 11

Kopplung von hochmolekularer HES (HES-130 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

9.75 g HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (6-7 ml) gelöst und anschließend 50 mg HSA, gelöst in 1 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4), zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Magnetrührer gerührt. Die Lösung wurde dann mit NaBH_3CN (50-70 mg) gemischt und einige Minuten leicht gerührt. Die Lösung wurde weiter alle zwei Stunden für 15 Minuten gerührt. Danach wurde ein weiteres Aliquot von NaBH_3CN (etwa 50 mg) zugegeben. Am Ende (nach fast 36 h Reaktionszeit) war eine Gesamtmenge von 285 mg NaBH_3CN eingesetzt worden. Die Lösung wurde dann dialysiert und lyophilisiert. Die Analyse erfolgte wie in Beispiel 4 beschrieben. Die Kopplungseffizienz betrug etwa 65%.

Beispiel 12

Kopplung von niedermolekularer HES (HES-10 kD) an Humanserumalbumin (HSA)

4.5 g HES wurden vollständig in Wasser (4-5 ml) gelöst und dann 50 mg HSA, gelöst in 1 ml 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4), zugegeben. Als die Lösung klar war, erforderlichenfalls durch Rühren mit einem Magnetrührer bewirkt, wurde NaBH_4 (50-70 mg) zugegeben und unter leichtem Rühren eingemischt. Die Lösung wurde ohne Rühren zwei Stunden lang stehengelassen und dann alle zwei Stunden für 15 Minuten gerührt, wie bei der Reaktion mit hochmolekularer HES. Als die Lösung keine Blasen (H_2 -Entwicklung) mehr zeigte, wurde ein weiteres Aliquot von NaBH_4 (etwa 50 mg) zugegeben. Am Ende war eine Gesamtmenge von 180 mg NaBH_4

eingesetzt worden. Die Lösung wurde dann dialysiert und lyophilisiert. Die Analyse erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie (GPC), die Ausbeute lag bei ca. 15%.

BEISPIEL 13

Kopplung von HES-40 kD an Asparaginase

3.0 g HES-40 kD wurden vollständig in Wasser (ca. 4 ml) gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 80 mg Asparaginase (Sigma, Taufkirchen) in 6 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9.0, gegeben und solange gerührt bis die Reaktionsmischung klar war. Anschließend wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht und nach 2 h ca. 50 mg NaBH₃CN zugegeben. Dieser Reaktionszyklus wurde noch 3x wiederholt. Zur Aufarbeitung des Produkts wurde die Reaktionsmischung gegen 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4, dialysiert. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt betrug ca. 61%, wobei ca. 73% der Asparaginaseaktivität wiedergefunden werden konnten.

BEISPIEL 14

Kopplung von HES-130 kD an humanes Interleukin-2 (IL-2)

50 mg HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (ca. 0.2 ml) gelöst. Dazu wurde eine Suspension von 0.25 mg humanes IL-2 (Sigma, Taufkirchen) in 0.2 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9.0, gegeben und solange gerührt, bis die Reaktionsmischung klar war (4 h). Im Abstand von je 4 h wurden jeweils 1 mg NaBH₃CN zugegeben und weitergerührt. Nach weiteren 24 h Reaktionszeit wurde gegen 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4, dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt betrug nach Analyse durch GPC ca. 42%.

BEISPIEL 15

Kopplung von HES-130 kD an Insulin

4.0 g HES-130 kD wurden vollständig in Wasser (ca. 6 ml) gelöst. Dazu wurden 55 mg Insulin aus Rinderpankreas (Sigma, Taufkirchen) in 7.5 ml 0.1 M Boratpuffer, pH 9.0, gegeben und für ca. 24 h bei 37 °C gerührt. Das Reduktionsmittel NaBH₃CN (60 mg in 30 ml) wurde über einen Zeitraum von 8 h langsam zugetropft. Anschließend wurde für weitere 24 h gerührt und die Reaktionsmischung durch Ultrafiltration (30

kD) von Salzen und nicht umgesetzten Reagentien befreit. Durch Lyophilisation wurde ein stabiles Kopplungsprodukt erhalten. Ca. 55% des eingesetzten Insulins wurden als HES-Konjugat wiedergefunden.

BEISPIEL 16

Kopplung von ox-HES-130 kD an Superoxiddismutase (SOD)

130 mg ox-HES-130 kD wurden vollständig in 6 ml PBS pH 6 gelöst und anschließend 10 mg SOD (Roche, Mannheim) gelöst in 1 ml PBS pH 6 zugegeben. Die Kopplungsreaktion wurde gestartet durch Zugabe von 10 mg EDC. Die Zugabe von EDC wurde alle 3 h wiederholt bis 39 mg des Carbodiimids verbraucht waren. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels GPC bei 258 nm. Nach 24 h wurden 50 % des Proteins im hochmolekularen Bereich der Trennsäule gefunden und die Reaktion abgebrochen. Die Reaktionsmischung wurde gegen 25 mM Phosphatpuffer pH 7.2 dialysiert und lyophilisiert. Die SOD-Aktivität betrug 95 % der Ausgangsaktivität. Die Bestimmung der Massenverteilung von HES-Protein-Proben mittels GPC-Lichtstreuung ergab ein molares Verhältnis von HES zu Protein von 1:1.

BEISPIEL 17

Kopplung von ox-HES 70 kD an Glucagon

In einem Rundkolben wurden Glucagon (66×10^{-9} mol, 0.23 mg), oxHES 70 kD (6.6×10^{-6} mol, 123 mg) in Phosphat-Puffer (1 ml, pH 5) gelöst. In Zeitabständen von 1 h wurden 26 mg EDC in 10 Portionen hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 24 h, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Wasser abgebrochen. Das Kopplungsprodukt wurde durch nach Dialyse gegen Wasser durch GPC und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung erhielt man 88 mg weißes Kopplungsprodukt (73 %).

PATENTANSPRÜCHE

1. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat, dadurch gekennzeichnet, dass die bindende Wechselwirkung zwischen dem Hydroxyalkylstärkemolekül und dem Protein auf einer kovalenten Bindung beruht, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen (i) der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und (ii) einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Proteins ist, wobei die bei der Kopplungsreaktion unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion zur oben genannten kovalenten Bindung modifiziert sein kann.
2. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aus der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls durch chemische Umsetzung hervorgegangene funktionelle Gruppe eine der funktionellen Gruppen eines bifunktionellen Linkermoleküls ist, mit dem die endständige Aldehydgruppe umgesetzt wurde.
3. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktionsfähige funktionelle Gruppe des Proteins eine der funktionellen Gruppen eines bifunktionellen Linkermoleküls ist, welches an das Protein gekoppelt wurde.
4. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktionsfähige funktionelle Gruppe des Proteins durch rekombinante Veränderung der ursprünglichen Aminosäuresequenz in das Protein eingeführt wurde.
5. Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugat nach Anspruch 1, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen einer durch selektive Oxidation der endständigen

Aldehydgruppe gebildeten Carboxylgruppe oder aktivierten Carboxylgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer primären Aminogruppe oder Thiolgruppe des Proteins ist.

6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung eine Amidbindung ist, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen einem durch selektive Oxidation der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls gebildeten aktivierten Carboxylgruppe und einer primären Aminogruppe des Proteins ist.
7. Konjugat nach Anspruch 1, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalente Bindung eine Aminbindung ist, welche das Ergebnis einer Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer primären Aminogruppe des Proteins unter Bildung einer Schiff'schen Base und der Reduktion der Schiff'schen Base zum Amin ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 4 bis etwa 1000 kD aufweist.
9. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht von etwa 4 bis etwa 50 kD aufweist.
10. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht von etwa 70 bis etwa 1000 kD aufweist.
11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Molekulargewicht von etwa 130 kD aufweist.
12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül einen Substitutionsgrad von etwa 0,3 bis etwa 0,7 aufweist.

13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Verhältnis der C₂- zu C₆-Substitution von 8 bis 12 aufweist.
14. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydroxyalkylstärkemolekül ein Hydroxyethylstärkemolekül ist.
15. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein eine regulatorische oder katalytische Funktion, eine Signalvermittlungs- oder Transportfunktion oder eine Funktion bei der Immunreaktion oder Auslösung einer Immunreaktion besitzt.
16. Konjugat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein aus der Gruppe aus Enzymen, Antikörpern, Antigenen, Transportproteinen, Bioadhäsionsproteinen, Hormonen und Prohormonen, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Cytokinen, Rezeptoren, Suppressoren, Aktivatoren, Inhibitoren oder einem funktionellen Derivat oder Fragment davon ausgewählt ist.
17. Konjugat nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein α -, β - oder γ -Interferon, ein Interleukin, ein Serumprotein, z.B. Albumin oder ein Gerinnungsfaktor, Erythropoietin, Myoglobin, Hämoglobin, ein Plasminogenaktivator, BCGF, BDGF, EGF, FGF, NGF, PDGF, BDNF, CNTF, TGF- α , TGF- β , ein Kolonie-stimulierender Faktor, ein BMP, Somatomedin, Somatotropin, Somatostatin, Insulin, Gonadotropin, α -MSH, Triptorelin, Prolactin, Calcitonin, Glucagon, ein Glucagon-ähnliches Peptid, z.B. GLP-1 oder GLP-2, Exendin, Leptin, Gastrin, Secretin, ein Integrin, ein Hypothalamushormon, z.B. ein ADH, Oxytocin, ein Liberin oder Statin, ein Schilddrüsenhormon, z.B. Thyroxin, Thyrotropin, Thyroliberin, ein Wachstumshormon, z.B. Human-Wachstumshormon, LH, FSH, ein Pigmenthormon, TNF- α oder TNF- β , Hirudin, ein Lipoprotein oder Apo-Lipoprotein, z.B. Apo-B, Apo-E, Apo-L_a, ein Oligolysin-Protein, ein RGD-Protein, ein Lektin oder Ricin, Bienengift oder ein Schlangengift, ein Immunotoxin, Ragweed-Allergen,

Antigen E, ein Immunglobulin, oder ein Rezeptor für eines dieser Proteine oder ein funktionelles Derivat oder Fragment eines dieser Proteine oder Rezeptoren ist.

18. Konjugat nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ein Enzym ist, welches aus einer Asparaginase, Arginase, Arginindeaminase, Adenosindeaminase, Glutaminase, Glutaminase-Asparaginase, Phenylalaninammoniumlyase, Tryptophanase, Tyrosinase, Superoxiddismutase, Endotoxinase, Catalase, Peroxidase, Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Thermolysin, einer Lipase, Uricase, Adenosindiphosphatase, Purinnukleosidphosphorylase, Bilirubinoxidase, Glucoseoxidase, Glucodase, Gluconatoxidase, Galaktosidase, Glucocerebrosidase, Glucuronidase, Hyaluronidase, Gewebefaktor, einem Gewebeplasminogen-aktivator, Streptokinase, Urokinase, einer MAP-Kinase, DNase, RNase, Lactoferrin, und funktionellen Derivaten oder Fragmenten davon ausgewählt ist.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 18 sowie einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und gegebenenfalls weitere Hilfs- und Wirkstoffe.
20. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 18 oder einer Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur therapeutischen oder präventiven Behandlung von Menschen oder Tieren.
21. Verfahren zur Herstellung eines Hydroxyalkylstärke-Protein-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass in wäßriger Lösung eine Kopplungsreaktion zwischen der endständigen Aldehydgruppe oder einer aus dieser Aldehydgruppe durch chemische Umsetzung hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls und einer mit dieser Aldehydgruppe oder daraus hervorgegangenen funktionellen Gruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls reaktionsfähigen funktionellen Gruppe des Proteins durchgeführt wird und die bei der Kopplungsreaktion

unmittelbar resultierende Bindung gegebenenfalls durch eine weitere Reaktion modifiziert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium der Kopplungsreaktion Wasser oder eine Mischung aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel ist, wobei der Wasseranteil der Mischung mindestens 80% beträgt.
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die endständige Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls durch selektive Oxidation in die entsprechende Carboxylfunktionalität überführt und diese anschließend unter Aktivierungsbedingungen in wässriger Lösung mit einer freien Aminogruppe des Proteins umgesetzt wird, so dass das Hydroxyalkylstärkemolekül durch eine Amidbindung an das Protein gebunden wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die selektive Oxidation der Aldehydgruppe mit Iod oder Metallionen in wässriger basischer Lösung durchgeführt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungsreaktion in Gegenwart eines Carbodiimids durchgeführt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Carbodiimid 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) ist.
27. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die endständige Aldehydgruppe des Hydroxyalkylstärkemoleküls mit einer freien Aminogruppe des Proteins unter Bildung einer Schiff'schen Base gekoppelt wird und die gebildete Schiff'sche Base zum Amin reduziert wird, so dass das Hydroxyalkylstärkemolekül durch eine Aminbindung an das Protein gebunden wird.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass sowohl Kopplung als auch Reduktion in wässriger Lösung stattfinden.
29. Verfahren nach Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Reduktionsmittel Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid oder ein organischer Borkomplex ist.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungs- und Reduktionsreaktionen gleichzeitig durchgeführt werden.
31. Verfahren zur Herstellung von selektiv an der endständigen Aldehydgruppe oxidierter Hydroxyalkylstärke, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyalkylstärke in einem Molverhältnis von Iod zu HAS von 2:1 bis 20:1 in wässriger basischer Lösung umgesetzt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis von Iod zu HAS etwa 5:1 bis 6:1 beträgt.
33. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) eine Menge von Hydroxyalkylstärke in warmem destilliertem Wasser gelöst wird und etwas weniger als 1 Moläquivalent wässriger Iodlösung zugegeben wird,
 - b) NaOH-Lösung in einer molaren Konzentration, die etwa das 5-15fache der Iodlösung beträgt, langsam tropfenweise in Abständen von mehreren Minuten der Reaktionslösung zugegeben wird, bis die Lösung nach der Zugabe beginnt, wieder klar zu werden,
 - c) erneut etwas weniger als 1 Moläquivalent wässriger Iodlösung der Reaktionslösung zugegeben wird,
 - d) das Zutropfen der NaOH-Lösung wieder aufgenommen wird,
 - e) die Schritte b) bis d) solange wiederholt werden, bis etwa 5,5-6 Moläquivalente Iodlösung und 11-12 Moläquivalente NaOH-Lösung, bezogen auf die Hydroxyalkylstärke, zugegeben worden sind,

- f) die Reaktion dann abgebrochen und die Reaktionslösung entsalzt und einer Kationenaustauschchromatographie unterworfen und das Reaktionsprodukt durch Lyophilisierung gewonnen wird.
34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der wäßrigen Iodlösung um eine etwa 0,05 - 0,5 N Iodlösung handelt.
35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, dass die molare Konzentration der NaOH-Lösung etwa das 10fache der Iodlösung beträgt.
36. Verfahren zur Herstellung von selektiv an der endständigen Aldehydgruppe oxidierter Hydroxyalkylstärke, dadurch gekennzeichnet, dass die HAS in wäßriger alkalischer Lösung mit einem molaren Überschuß an stabilisierten Metallionen, ausgewählt aus Cu^{2+} -Ionen und Ag^+ -Ionen, oxidiert wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 03/02083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48 C08B31/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 01158 A (SOMMERMEYER KLAUS ; EICHNER WOLFRAM (DE); FRESENIUS AG (DE)) 15 January 1998 (1998-01-15)	1-35
Y	the whole document	36
Y	DE 22 33 977 A (UNILEVER NV) 1 February 1973 (1973-02-01)	36
	the whole document	
A	WO 99 49897 A (HEMOSOL INC) 7 October 1999 (1999-10-07)	1-36
	cited in the application the whole document	
P, X	WO 02 080979 A (SOMMERMEYER KLAUS ; FRIE SVEN (DE); EICHNER WOLFRAM (DE); SCHARPF R) 17 October 2002 (2002-10-17)	1-32, 34
	example 1; table 1	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2003

Date of mailing of the international search report

21/05/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/02083

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claim 20 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internal Application No
 PCT/EP 03/02083

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9801158	A	15-01-1998	DE 19628705 A1	15-01-1998
			AT 209931 T	15-12-2001
			AU 710879 B2	30-09-1999
			AU 3541197 A	02-02-1998
			BR 9710865 A	11-01-2000
			CA 2258947 A1	15-01-1998
			DE 59705678 D1	17-01-2002
			DK 912197 T3	18-03-2002
			WO 9801158 A2	15-01-1998
			EP 0912197 A2	06-05-1999
			ES 2166551 T3	16-04-2002
			JP 2000514434 T	31-10-2000
			PT 912197 T	31-05-2002
			US 6083909 A	04-07-2000
DE 2233977	A	01-02-1973	US 3873614 A	25-03-1975
			CA 959047 A1	10-12-1974
			DE 2233977 A1	01-02-1973
			FR 2145722 A1	23-02-1973
			GB 1385403 A	26-02-1975
			IT 964665 B	31-01-1974
			NL 7209737 A	16-01-1973
			SE 395008 B	25-07-1977
WO 9949897	A	07-10-1999	AU 2918099 A	18-10-1999
			CA 2326715 A1	07-10-1999
			WO 9949897 A1	07-10-1999
			CN 1301179 T	27-06-2001
			EP 1066057 A1	10-01-2001
			JP 2002509898 T	02-04-2002
			US 2002040128 A1	04-04-2002
WO 02080979	A	17-10-2002	DE 10112825 A1	02-10-2002
			WO 02080979 A2	17-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internal Aktenzeichen

PCT/EP 03/02083

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A61K47/48 C08B31/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 A61K C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 01158 A (SOMMERMEYER KLAUS ;EICHNER WOLFRAM (DE); FRESENIUS AG (DE)) 15. Januar 1998 (1998-01-15)	1-35
Y	das ganze Dokument	36
Y	DE 22 33 977 A (UNILEVER NV) 1. Februar 1973 (1973-02-01)	36
	das ganze Dokument	
A	WO 99 49897 A (HEMOSOL INC) 7. Oktober 1999 (1999-10-07) in der Anmeldung erwähnt	1-36
	das ganze Dokument	
P, X	WO 02 080979 A (SOMMERMEYER KLAUS ;FRIE SVEN (DE); EICHNER WOLFRAM (DE); SCHARPF R) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Beispiel 1; Tabelle 1	1-32, 34

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Mai 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/05/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schwachtgen, J-L

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 20 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intema .Kenzeichen

PCT/EP 03/02083

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9801158	A	15-01-1998	DE 19628705 A1	15-01-1998
			AT 209931 T	15-12-2001
			AU 710879 B2	30-09-1999
			AU 3541197 A	02-02-1998
			BR 9710865 A	11-01-2000
			CA 2258947 A1	15-01-1998
			DE 59705678 D1	17-01-2002
			DK 912197 T3	18-03-2002
			WO 9801158 A2	15-01-1998
			EP 0912197 A2	06-05-1999
			ES 2166551 T3	16-04-2002
			JP 2000514434 T	31-10-2000
			PT 912197 T	31-05-2002
			US 6083909 A	04-07-2000
DE 2233977	A	01-02-1973	US 3873614 A	25-03-1975
			CA 959047 A1	10-12-1974
			DE 2233977 A1	01-02-1973
			FR 2145722 A1	23-02-1973
			GB 1385403 A	26-02-1975
			IT 964665 B	31-01-1974
			NL 7209737 A	16-01-1973
			SE 395008 B	25-07-1977
WO 9949897	A	07-10-1999	AU 2918099 A	18-10-1999
			CA 2326715 A1	07-10-1999
			WO 9949897 A1	07-10-1999
			CN 1301179 T	27-06-2001
			EP 1066057 A1	10-01-2001
			JP 2002509898 T	02-04-2002
			US 2002040128 A1	04-04-2002
WO 02080979	A	17-10-2002	DE 10112825 A1	02-10-2002
			WO 02080979 A2	17-10-2002